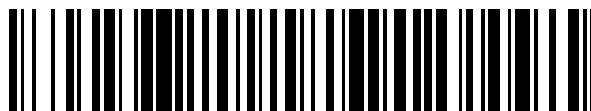


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 041**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2006.01)

**C12N 5/0775** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2013** E 13185828 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017** EP 2712920

54 Título: **Método de lavado celular adherentes usando solución de lavado celular que contiene trehalosa**

30 Prioridad:

**28.09.2012 JP 2012216630**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**29.05.2017**

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC.  
(100.0%)  
115, Aza Kuguhara Tateiwa, Muya-cho  
Naruto-shi, Tokushima 772-8601, JP**

72 Inventor/es:

**KOBAYASHI, EIJI;  
WADA, TAMAKI y  
DOI, MASAKO**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 614 041 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método de lavado celular adherentes usando solución de lavado celular que contiene trehalosa

**5 Sector de la técnica**

La presente invención se refiere al uso de trehalosa, su derivado o una sal de la misma para reducir la muerte de células adherentes debido al tratamiento enzimático proteolítico, en el que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma se usa en un tratamiento de lavado celular antes del tratamiento enzimático proteolítico.

10

**Estado de la técnica**

En los últimos años, el rápido progreso de los estudios con células madre ha aumentado el impulso hacia la medicina regenerativa, y el conocimiento y la comprensión de este fenómeno se ha extendido no solo entre los investigadores, sino también entre el público. La medicina regenerativa con células madre es medicina destinada al restablecimiento de la función de las células y tejidos dañados por diversas enfermedades utilizando el potencial de auto-renovación y multipotencia de células madre o factores secretados por las células madre. El trasplante de médula ósea en pacientes que tienen enfermedades hematológicas intratables como la leucemia y la anemia aplásica resulta en el injerto de células progenitoras hematopoyéticas en el cuerpo de estos pacientes, que permite el mantenimiento de la capacidad hematopoyética durante casi toda la vida. Recientemente, muchos investigadores han apuntado a la aplicación clínica con células madre que no sean células madre hematopoyéticas, han identificado células madre en los nervios centrales, los nervios periféricos, la médula ósea, el intestino delgado, y similares, y han comenzado a poner en práctica el tratamiento de trasplante de células madre de tejido de enfermedad traumática y enfermedad de degeneración del tejido (documentos no de patente 1 a 3).

25

Las células madre utilizadas para el tratamiento del trasplante se pueden recoger en una cantidad extremadamente baja del cuerpo vivo; por lo tanto, generalmente se ha realizado para proliferar las células madre recolectadas por subcultivo *in vitro* (Documento de patente 1). Normalmente se utiliza una enzima proteolítica, tal como la tripsina, para desprender las células madre de un recipiente de cultivo durante el subcultivo; sin embargo, se considera problemático que las células resulten dañadas por el tratamiento con las enzimas proteolíticas y mueran en una cierta cantidad. A fin de aplicar una medicina regenerativa de alta calidad, y a pesar de que es necesario proporcionar una cantidad suficiente (número) de células madre, a la vez es importante proporcionar células de alta calidad, en concreto, (población) de células madre en las que el porcentaje de células vivas es alto; por lo tanto, el desarrollo de un método capaz de suprimir la muerte celular debido al tratamiento enzimático proteolítico durante el subcultivo se ha considerado una necesidad urgente.

30

35

La trehalosa es un tipo de disacárido formado por la unión 1,1-glucósido de glucosas. La trehalosa se utiliza en diversos alimentos y cosméticos, ya que presenta un sabor dulce y tiene una alta capacidad de retención de agua. La trehalosa también se utiliza como ingrediente activo de una solución órgano-protectora en el trasplante de órganos, ya que tiene las propiedades de estabilización de la membrana celular y supresión del daño celular. Se han desarrollado excelentes soluciones protectoras de órganos que contienen trehalosa, tal como la solución ET-Kyoto y la solución de New ET-Kyoto (documentos de patente 2 y 3 y el documento no de patente 4). Los presentes inventores sorprendentemente encontraron que el lavado de las células adherentes con una solución acuosa fisiológica que contiene trehalosa antes de desprender las células de un recipiente de cultivo por una enzima proteolítica tal como la tripsina puede suprimir la muerte celular debido al tratamiento enzimático proteolítico. Hasta donde saben los presentes inventores, en la técnica anterior no se ha descrito una propiedad de la trehalosa de ese tipo.

40

45

**Documentos de la técnica anterior**

50

**Documentos de patentes**

Documento de patente 1: Patente de Estados Unidos n.º 5486359

Documento de patente 2: Patente Japonesa n.º 3253131

55

Documento de patente 3: Publicación Internacional n.º WO 2007/043698

**Documentos no de patente**

Documento no de patente 1: Gage, FH Science 287: 1433-1438 (2000)

60

Documento no de patente 2: Morrison, SJ et al., Cell 96: 737-749 (1999)

Documento no de patente 3: Batle, E. et al., Cell 111: 251-263 (2002)

Documento no de patente 4: Chem, F. et al., Yonsei Med. J. 45: 1107-1114 (2004)

65

**Objeto de la invención****Objeto a resolver por la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método capaz de suprimir eficazmente la muerte celular debido al tratamiento enzimático proteolítico para desprender la célula adherente de un recipiente de cultivo y el posterior tratamiento celular.

5

### Medios para resolver el objeto

Los presentes inventores han encontrado que el lavado celular madre mesenquimales deprendidas de un recipiente de cultivo de células por tratamiento enzimático proteolítico con una solución acuosa fisiológica que contiene trehalosa suprime la muerte de las células madre mesenquimales (Solicitud de patente Japonesa n.º 2011-072068). Debido a que el daño de las células por tratamiento enzimático proteolítico indujo una vía de muerte celular (apoptosis o similares), se consideró que dicho efecto por la trehalosa era debido a la supresión de una vía de la apoptosis o la promoción de la función de la reparación del daño celular. Sin embargo, en estudios intensivos para resolver los problemas anteriores, se ha encontrado que cuando las células pasaron a lavarse con una solución de Ringer con adición de lactato que contiene trehalosa (en adelante abreviado como "LRT") antes del tratamiento enzimático proteolítico, la muerte celular se puede suprimir efectivamente comparada con el caso en el que se utiliza la solución de lactato de Ringer (en adelante abreviado como "LR") o solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control o el caso del lavado celular con LRT después del tratamiento enzimático proteolítico, logrando así la presente invención.

10

15

20

Específicamente, la presente invención se refiere a (1) el uso de trehalosa o su derivado o una sal de la misma para reducir la muerte de células adherentes debido al tratamiento enzimático proteolítico; en el que se usa la trehalosa, su derivado o una sal de la misma en un tratamiento de lavado celular antes del tratamiento enzimático proteolítico, en el que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma usada en el tratamiento de lavado celular antes del tratamiento enzimático proteolítico está en una solución acuosa fisiológica en una concentración del 0,1 al 20 % (p/v), en la que el tiempo de tratamiento del tratamiento de lavado celular antes del tratamiento enzimático proteolítico está en el intervalo de 1 segundo a 20 minutos y en el que el derivado de trehalosa es una glicosiltrehalosa en la que una o más unidades de azúcar están unidas a trehalosa como disacárido; (2) el uso de acuerdo con (1), en el que las células son células madre mesenquimales; y (3) el uso de acuerdo con (1) o (2), en el que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma se encuentra en una solución acuosa fisiológica en una concentración del 1 al 15 % (p/v).

25

30

También se describe (4) un método para lavar una célula adherente, que comprende lavar la célula adherente usando una solución de lavado celular que comprende una solución acuosa fisiológica añadida con trehalosa o su derivado o una sal de la misma, antes de desprender la célula adherente de un recipiente de cultivo mediante tratamiento enzimático proteolítico, (5) el método de acuerdo con (4), en el que la célula adherente es una célula madre mesenquimal, y (6) el método de acuerdo con (4) o (5), en el que la solución de lavado celular comprende trehalosa o su derivado o una sal de la misma en una concentración del 1 al 15 % (p/v).

35

También se describe (7) un método para producir una suspensión celular para trasplante, que comprende las etapas de (a) retirar un medio en un recipiente de cultivo al que se adhiere una célula adherente y lavar la célula adherente con una solución de lavado celular que comprende una solución acuosa fisiológica añadida con trehalosa o su derivado o una sal de la misma; (b) desprender la célula adherente del recipiente de cultivo mediante tratamiento enzimático proteolítico; (c) suspender la célula adherente desprendida del recipiente de cultivo en una solución acuosa fisiológica que contiene una proteína para preparar una suspensión celular; y (d) retirar la solución en la suspensión celular y lavar la célula adherente con la solución acuosa fisiológica, (8) el método de producción de acuerdo con (7), en el que la célula adherente es una célula madre mesenquimal, (9) el método de producción de acuerdo con (7) o (8), en el que la solución de lavado celular de la etapa (a) comprende trehalosa o su derivado o una sal de la misma en una concentración del 1 al 15 % (p/v), (10) el método de producción de acuerdo con cualquiera de (7) a (9), en el que la enzima proteolítica de la etapa (b) es tripsina, (11) el método de producción de acuerdo con cualquiera de (7) a (10), en el que la solución acuosa fisiológica que contiene proteína de la etapa (c) además comprende trehalosa o su derivado o una sal de la misma, (12) el método de producción de acuerdo con cualquiera de (7) a (11), en el que la solución acuosa fisiológica que contiene la proteína de la etapa (c) es un medio basal que contiene suero para el cultivo de células animales y (13) el método de producción de acuerdo con una cualquiera de (7) a (12), en el que la solución acuosa fisiológica de la etapa (d) comprende además trehalosa o su derivado o una sal de la misma.

40

45

50

55

También se describe (14) un kit para producir una suspensión celular para trasplante, que comprende una solución acuosa fisiológica y trehalosa, su derivado de una sal de la misma y una solución acuosa fisiológica que comprende una enzima proteolítica; y (15) el kit de acuerdo con (14), que comprende un prospecto en el envase que describe un efecto supresor de muerte celular debido al tratamiento enzimático proteolítico mediante la solución de lavado celular.

60

También se describe (16) trehalosa o su derivado o una sal de la misma para su uso para lavar una célula adherente antes de desprender la célula adherente de un recipiente de cultivo mediante tratamiento enzimático proteolítico.

65

También se describe (17) una solución de lavado celular para lavar una célula adherente antes de desprender la célula adherente de un recipiente de cultivo mediante tratamiento enzimático proteolítico, que comprende una solución acuosa fisiológica añadida con trehalosa o su derivado o una sal de la misma, (18) la solución de lavado celular de acuerdo con (17), en la que la célula adherente es una célula madre mesenquimal, y (19) la solución de lavado celular de acuerdo con (17) o (18), que comprende trehalosa o su derivado o una sal de la misma en una concentración del 1 al 15 % (p/v).

También se describe una combinación de una solución acuosa fisiológica y trehalosa o su derivado o una sal de la misma para lavar una célula adherente antes de desprender la célula adherente de un recipiente de cultivo mediante tratamiento enzimático proteolítico y trehalosa o su derivado o una sal de la misma para su uso por adición a una solución acuosa fisiológica para lavar una célula adherente antes de desprender la célula adherente de un recipiente de cultivo mediante tratamiento enzimático proteolítico. Además, también se describe un método de subcultivo *in vitro* para una célula adherente, que comprende lavar la célula adherente utilizando una solución acuosa fisiológica que comprende trehalosa o su derivado o una sal de la misma y un kit para el subcultivo *in vitro* de una célula adherente, que comprende trehalosa o su derivado o una sal de la misma y un prospecto en el envase que describe un efecto supresor de muerte celular debido al tratamiento enzimático proteolítico.

### Efecto de la invención

De acuerdo con la presente invención, la cantidad de células muertas se puede reducir en una suspensión de células para trasplante de células madre que contiene células madre tales como células madre mesenquimales, y se puede proporcionar una suspensión de células de buena calidad para el trasplante en medicina regenerativa.

### Descripción de las figuras

[Figura 1] La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de analizar el efecto de la supresión de la muerte celular cuando las células adherentes se lavaron usando LRT antes del tratamiento con tripsina (en la figura, "solución de lavado antes del tratamiento enzimático; LRT, solución de lavado después del tratamiento enzimático; PBS"). Se utilizó PBS como control (en la figura, "solución de lavado antes del tratamiento enzimático; PBS, solución de lavado después del tratamiento enzimático; PBS), y se utilizó LRT después del tratamiento con tripsina como Ejemplo comparativo 1 (en la figura, "solución de lavado antes del tratamiento enzimático; PBS, solución de lavado después del tratamiento enzimático; LRT"). La ordenada muestra la cantidad de células muertas (media  $\pm$  desviación típica, [n = 8]) En la figura, "\*\*\*\*" muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa con el ensayo de Tukey entre los 4 grupos ( $p < 0,001$ ).

[Figura 2] La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de analizar el efecto de la supresión de la muerte celular cuando las células adherentes se lavaron durante 0,5 a 10 minutos utilizando LRT antes del tratamiento con tripsina. Se utilizaron LR y PBS como controles. La ordenada muestra la cantidad de células muertas (media  $\pm$  desviación típica, [n = 8]). En la figura, "\*\*\*\*" indica que existen diferencias estadísticamente significativas frente a PBS y LR por el ensayo de Tukey para cada tiempo de lavado ( $p < 0,001$ ).

[Figura 3] La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de analizar el efecto de la supresión de la muerte celular cuando las células adherentes se lavaron usando LRT cada una que tiene una concentración (1, 3, 5, 7, 10, 12, o 15 % [p/v]) de trehalosa antes del tratamiento con tripsina. Se utilizó LR como control. La ordenada muestra la cantidad de células muertas (media  $\pm$  desviación típica, [n = 12]). En la figura, "\*\*\*\*" y "\*\*\*\*\*" muestran que existen diferencias estadísticamente significativas contra LR mediante el ensayo de Dunnett ( $p < 0,005$  y  $p < 0,001$ , respectivamente).

[Figura 4] La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de analizar el efecto de la supresión de la muerte celular cuando se añade trehalosa en el tratamiento con tripsina o en el tratamiento de terminación de una reacción de tripsina. En la figura, "tripsina + T" muestra una solución de tripsina que contiene trehalosa, y, en la figura, "medio + T" muestra un medio de MSC humano que contiene FBS y trehalosa. La ordenada muestra la cantidad de células muertas (media  $\pm$  desviación típica, [n = 6]). En la figura, "\*\*\*\*" muestra que existen diferencias estadísticamente significativas frente a PBS y LR por el ensayo de Tukey ( $p < 0,001$ ), y en la figura, "\*\*\*\*" muestra que existen diferencias estadísticamente significativas frente a PBS y LR mediante el ensayo de Tukey ( $p < 0,001$  y  $p < 0,005$ , respectivamente).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso, preferentemente *in vitro*, de trehalosa o su derivado o una sal de la misma (en lo sucesivo denominada "una trehalosa") para reducir la muerte de células adherentes debido al tratamiento enzimático proteolítico, en el que se utiliza la trehalosa, su derivado o una sal de la misma en un tratamiento de lavado celular antes del tratamiento con enzima proteolítica, en el que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma usada en el tratamiento de lavado celular antes del tratamiento enzimático proteolítico está en una solución acuosa fisiológica en una concentración del 0,1 al 20 % (p/v), en la que el tiempo de tratamiento del tratamiento de lavado celular antes del tratamiento con enzima proteolítica está en el intervalo de 1 segundo a 20 minutos y en el que el derivado de trehalosa es una glicosiltrehalosa en la que una o más unidades de azúcar están unidas a trehalosa como disacárido. La trehalosa es eficaz para reducir la muerte de células adherentes cuando se usa en el lavado celular antes o después del tratamiento con enzimas proteolíticas, así como en la solución de terminación de

una reacción enzimática. En una primera realización, se usa la trehalosa en el lavado celular antes del tratamiento con enzimas proteolíticas. En una segunda realización, se usa la trehalosa en el lavado celular antes y después del tratamiento con enzimas proteolíticas. En una tercera realización, se usa la trehalosa en el lavado celular antes del tratamiento con enzimas proteolíticas y en la solución de terminación de una reacción enzimática. En una cuarta realización, se usa la trehalosa en el lavado celular antes y después del tratamiento con enzimas proteolíticas, y en la solución de terminación de una reacción enzimática.

La tasa de mortalidad normalmente se redujo a menos del 30 %, preferentemente menos del 20 %, más preferentemente menos del 17 %, incluso más preferentemente menos del 15 %.

El método de lavado es un método que implica el lavado de una célula adherente tal como una célula de mamífero en un recipiente de cultivo del que se retira un medio de antemano con un aspirador o similar, utilizando trehalosa o su derivado o una sal de la misma, normalmente en forma de solución de lavado celular que contiene una solución fisiológica acuosa y trehalosa o su derivado o una sal de la misma añadida a la solución acuosa fisiológica, es decir, una solución acuosa fisiológica que contiene trehalosa, antes de desprender la célula adherente del recipiente de cultivo por tratamiento enzimático proteolítico, en el que la solución de lavado celular de la presente invención está destinada a ser específica para su uso como solución de lavado celular para el lavado de una célula adherente antes de desprender la células adherentes de un recipiente de cultivo por tratamiento enzimático proteolítico. Para los fines de la presente invención, una célula adherente significa una célula que depende del anclaje capaz de sobrevivir, proliferar y producir sustancias mediante la adhesión al anclaje. Los ejemplos específicos de células adherentes pueden incluir células madre multipotentes (células madre embrionarias [células ES], células EG, células iPS, y similares), células madre mesenquimales, células madre neurales, células madre mieloides, y las células madre germinales; entre ellas, son preferibles las células madre mesenquimales. Los ejemplos de mamíferos pueden incluir roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas, lagomorfos tales como conejos, ungulados como cerdos, vacas, cabras, caballos y ovejas, carnívoros tales como perros y gatos y primates tales como seres humanos, monos rhesus, mono, mono cynomolgus, títis, orangutanes y chimpancés; entre ellos, se pueden ejemplificar preferentemente los ratones, cerdos y seres humanos. Ejemplos de células de mamíferos pueden incluir células de los islotes pancreáticos de mamífero administradas por vía intravenosa a los pacientes con diabetes de tipo I, y células dendríticas de mamíferos, células asesinas naturales, linfocitos T alfa beta, linfocitos T gamma delta y linfocitos T citotóxicos (CTL) administrados por vía intravenosa a pacientes con cáncer además de las células madre de mamíferos administradas a través de los vasos sanguíneos para medicina regenerativa o similares.

La solución acuosa fisiológica aplicada a la solución de lavado celular no está particularmente limitada a condición de que sea una solución acuosa isotónica en la que las concentraciones de sal y azúcar y similares se ajusten con sodio, potasio y similares para proporcionar casi la misma presión osmótica que la del fluido corporal o fluido celular. Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir solución salina fisiológica, soluciones salinas que tienen un efecto tamponante (solución salina tamponada con fosfato, PBS, solución salina tamponada con Tris, TBS, solución salina tamponada con HEPES y similares), solución de Ringer (solución de lactato de Ringer, y similares), una solución acuosa de glucosa al 5 %, medios basales para cultivo de células animales (DMEM, EMEM, RPMI-1640,  $\alpha$ -MEM, F-12, F-10, M-199, y similares), y agentes isotónicos (azúcar de uva, D-sorbitol, D-manitol, lactosa, cloruro de sodio, y similares); entre ellas, se prefieren soluciones salinas que tienen un efecto tampón y soluciones de Ringer, más preferentemente PBS y solución de lactato de Ringer. La solución acuosa fisiológica puede ser una disponible en el mercado o una de elaboración propia. Ejemplos de las que están disponibles en el mercado pueden incluir D-PBS (-) (de Invitrogen), solución salina fisiológica ("solución salina normal Otsuka" de Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), solución de lactato de Ringer (Lactec Injection de Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) y un kit de medio específico para células madre mesenquimales humanas (de Lonza Group Ltd.). Como se usa en este documento, "isotónico" significa que la presión osmótica está en el intervalo de 250 a 380 mOsm/l. La solución acuosa fisiológica puede contener además un estabilizante (por ejemplo, albúmina de suero humano o polietilenglicol), un tampón (por ejemplo, tampón de fosfato o tampón de acetato sódico), un agente quelante (por ejemplo, EDTA, EGTA, ácido cítrico, o salicilato), un solubilizante, un conservante, un antioxidante, y similares.

Ejemplos de trehalosa como trehalosa usada en la presente invención pueden incluir  $\alpha$ ,  $\beta$ -trehalosa como disacárido en la que  $\alpha$ -glucosa y la  $\beta$ -glucosa están unidas por 1,1-glucósido, y  $\beta$ ,  $\beta$ -trehalosa como disacárido en la que 2 moléculas de  $\beta$ -glucosa están unidas por 1,1-glucósido, además de  $\alpha$ , $\alpha$ -trehalosa como disacárido en el que 2 moléculas de  $\alpha$ -glucosa están unidas por 1,1-glucósido; entre las que es preferible la  $\alpha$ , $\alpha$ -trehalosa. Estas trehalosas se pueden producir por cualquier método conocido tal como síntesis química, producción por un microorganismo, y producción por una enzima; sin embargo, también se pueden utilizar las disponibles en el mercado. Ejemplos de las mismas pueden incluir  $\alpha$ , $\alpha$ -trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) y  $\alpha$ , $\alpha$ -trehalosa (de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

El derivado de trehalosa como trehalosa usada en la presente invención no está limitado particularmente a condición de que sea una glicosiltrehalosa en la que una o más unidades de azúcar estén unidas a trehalosa como disacárido; las glicosiltrehalosas incluyen glicosiltrehalosa, maltosiltrehalosa y maltotriosiltrehalosa.

Ejemplos de sales de trehalosa o su derivado como trehalosa usada en la presente invención pueden incluir sales de adición de ácido tales como clorhidratos, bromhidratos, yodhidratos, fosfatos, nitratos, sulfatos, acetatos,

propionatos, toluenosulfonatos, succinatos, oxalatos, lactatos, tartratos, glicolatos, metanosulfonatos, butiratos, valeratos, citratos, fumaratos, maleatos, y malatos; sales metálicas tales como sales de sodio, sales de potasio, y sales de calcio; y sales de amonio y sales de alquilamonio. Estas sales cada una se utilizan en forma de solución en el momento de su uso, y su acción tiene preferentemente la misma potencia que la de la trehalosa. Estas sales pueden formar hidratos o solvatos, y se pueden utilizar solas o en una combinación adecuada de dos o más de las mismas.

La concentración de una trehalosa tal como se aplica a la solución de lavado celular puede ser una concentración capaz de suprimir (inhibir) la muerte celular (apoptosis, necrosis, o similares) debido al tratamiento enzimático proteolítico, y su condición óptima se puede seleccionar apropiadamente dependiendo del tipo de la célula, el número de células en un recipiente de cultivo, la concentración de células, y similares. Una concentración más alta de una trehalosa tiene un efecto superior capaz de suprimir la muerte celular debido al tratamiento enzimático proteolítico; sin embargo, una concentración demasiado alta de trehalosa presenta la posibilidad de afectar adversamente a la supervivencia de las células. Por ejemplo, la concentración de trehalosa tal como se aplica a la solución de lavado celular de la presente invención normalmente es del 0,1 % (p/v) o más, preferentemente del 1 % (p/v) o más, más preferentemente del 3,0 % (p/v) o más, y normalmente es del 20 % (p/v) o menos, preferentemente del 15 % (p/v) o menos, más preferentemente del 7,0 % (p/v) o menos, todavía más preferentemente del 5,0 % (p/v) o menos a fin de evitar un efecto perjudicial sobre la tasa de supervivencia de las células. Por lo tanto, la concentración de trehalosa en la solución de lavado celular es del 0,1 al 20 % (p/v), preferentemente del 1,0 al 15 % (p/v), más preferentemente del 1,0 al 7,0 % (p/v), aún más preferentemente del 3,0 al 5,0 % (p/v). La capacidad de la solución de lavado celular para suprimir la muerte celular se puede confirmar usando cualquier método conocido capaz de detectar la muerte celular, tal como un método de tinción con azul de tripano, el método TUNEL, el método de la nexina, o el método FLICA.

Ejemplos de la enzima proteolítica que se usa para el tratamiento enzimático proteolítico pueden incluir tripsina, lisilendopeptidasa, pronasa, pepsina, elastasa, y colagenasa; entre ellas, como ejemplo preferentemente se puede mostrar la tripsina.

Las condiciones, tales como la temperatura y el tiempo, durante el lavado de las células adherentes, para el método de lavado pueden ser condiciones en las que se observa el efecto de la trehalosa usada en la presente invención y las células no resultan dañadas; la temperatura normalmente está en el intervalo de 20 a 37 °C y el tiempo de tratamiento normalmente está en el intervalo de 1 segundo a 20 minutos. Sin embargo, se observa el efecto de la trehalosa usada en la presente invención en la misma medida, al menos, en el intervalo de tiempo de tratamiento de 30 segundos a 10 minutos; por lo tanto, el tiempo de tratamiento preferentemente es de 30 segundos a 10 minutos. El número de operaciones de lavado puede ser de al menos una vez y también puede ser una pluralidad de veces (2, 3, 4 veces, o similares); sin embargo, en vista de la eficacia del tiempo y la rentabilidad es preferible una vez.

La solución de lavado celular se puede utilizar para producir una suspensión de células para el trasplante como sigue.

Las células adherentes que se han descrito anteriormente se subcultivan primero *in vitro* en un recipiente de cultivo para células adherentes (una placa multi-pocillos, una placa de cultivo [placa o placa de Petri], un matraz, o similares) de revestimiento tratadas con moléculas de adhesión celular (fibronectina, vitronectina, laminina, nidogen, o similares) o un polímero de (poli-L-ornitina, poli-lisina, o similares), o un recipiente de cultivo tratado en su superficie para las células adherentes. En el medio puede estar contenido un factor de inhibición de la actividad de una enzima proteolítica, tal como un inhibidor de la proteasa, o la función de la enzima proteolítica se puede inhibir competitivamente con una cantidad excesiva de proteína presente en el medio. Por lo tanto, antes de realizar el tratamiento enzimático proteolítico en la etapa siguiente, se retira por adelantado el medio en el recipiente de cultivo al que se adhieren las células adherentes con un aspirador o similar, seguido por lavado de las células con la solución de lavado celular que contienen poco o nada de proteína para retirar el medio restante. Las condiciones tales como la temperatura y el tiempo en el tratamiento de lavado pueden incluir las condiciones anteriores durante el lavado de las células adherentes para el método de lavado.

Entonces, las células adherentes se desprenden del recipiente de cultivo por tratamiento enzimático proteolítico. En esta ocasión, las células normalmente resultan dañadas disminuyendo la tasa de supervivencia de células en la población de células; sin embargo, el efecto de la trehalosa usada en la presente invención puede suprimir (inhibir) la disminución en la tasa de supervivencia celular.

El tratamiento enzimático proteolítico se lleva a cabo poniendo en contacto las células con una solución acuosa que contiene la enzima proteolítica. La solución acuosa que contiene la enzima proteolítica puede ser una solución acuosa en la que un polvo de enzima proteolítica disponible en el mercado de Gibco o similares se disuelve en la solución fisiológica acuosa anterior, o una solución de enzima proteolítica disponible en el mercado de Lonza Group Ltd. o similar, diluida con la solución acuosa fisiológica. La concentración de la enzima proteolítica en la solución acuosa que contiene la enzima proteolítica puede ser una concentración suficiente para desprender las células de acuerdo con el tipo de enzima proteolítica, y normalmente está en el intervalo del 0,05 al 0,25 % (p/v).

Las condiciones tales como la temperatura y el tiempo para el tratamiento enzimático proteolítico pueden ser condiciones bajo las cuales la mayoría (del 70 al 100 %) de las células se pueden desprender del recipiente de cultivo; la temperatura normalmente está en el intervalo de 20 a 37 °C, y el tiempo de tratamiento normalmente está en el intervalo de 15 segundos a 15 minutos. El tratamiento enzimático proteolítico de las células durante un período sostenido de tiempo normalmente puede dañar las células para disminuir la tasa de supervivencia de las mismas; sin embargo, las células difíciles de desprender de un recipiente de cultivo en un tiempo de tratamiento típico se pueden tratar durante un largo período de tiempo (de 10 a 30 minutos o similares), ya que puede suprimir la disminución en la tasa de supervivencia celular.

Posteriormente, para detener el tratamiento enzimático proteolítico, las células adherentes deprendidas del recipiente de cultivo se suspenden en una solución acuosa fisiológica que contiene proteínas. La suspensión se puede llevar a cabo mediante un método bien conocido en la técnica, tal como pipeteo o agitación suave. La solución acuosa fisiológica que contiene la proteína puede ser una solución acuosa fisiológica que contiene una proteína en una cantidad suficiente para suprimir la actividad de la enzima proteolítica. Ejemplos específicos de las mismas pueden incluir la solución acuosa fisiológica descrita anteriormente, que contiene del 0,1 al 30 % (v/v) de suero (suero bovino fetal [FBS], suero bovino de ternera [CA], o similares); se prefiere el medio basal para el cultivo de células animales que se ha descrito anteriormente, que contiene FBS. La solución acuosa fisiológica que contiene proteína preferentemente contiene además trehalosa como se ha descrito anteriormente puesto que se observó un efecto aditivo o sinérgico debido a la combinación con trehalosa usada en la presente invención.

A continuación, para retirar la enzima proteolítica de la suspensión de células y lavar las células adherentes, la solución se retira de la suspensión de células, seguido por lavado de las células adherentes usando la solución acuosa fisiológica descrita anteriormente como solución de lavado después del tratamiento enzimático proteolítico. La extracción de la solución de la suspensión de células se puede llevar a cabo separando la suspensión de células en el sobrenadante (solución) y el precipitado (células) usando una centrífuga y retirando el sobrenadante utilizando un aspirador o similar. Para mejorar el efecto de lavado, el precipitado se suspende preferentemente mediante pipeteo, agitación suave, o similar. El número de lavados de las células en la suspensión de células puede ser de al menos una vez, y también puede ser una pluralidad de veces (2, 3, 4 veces, o similares); sin embargo, se prefiere una vez en vista de la eficacia del tiempo y la rentabilidad. La solución acuosa fisiológica descrita anteriormente que se utiliza como solución de lavado después del tratamiento enzimático proteolítico preferentemente además contiene trehalosa como se ha descrito anteriormente debido a que se observó un efecto aditivo o sinérgico debido a la combinación con la trehalosa usada en la presente invención.

Las células después del lavado se separan en el sobrenadante (solución) y el precipitado (células) usando una centrífuga, y, después de retirar el sobrenadante utilizando un aspirador o similar, se suspenden en una solución acuosa para trasplantes adecuada para el trasplante por medios tales como medios intra-arteriales, intra-venosos, o percutáneos. Ejemplos específicos de la solución acuosa para el trasplante pueden incluir las soluciones acuosas fisiológicas descritas anteriormente; se prefiere la solución de Ringer, más preferentemente la solución de lactato de Ringer, la solución de acetato de Ringer, o la solución bicarbonatada de Ringer, todavía más preferentemente la solución de lactato de Ringer.

Los ejemplos del método de subcultivo *in vitro* para las células adherentes pueden incluir un método secuencial que comprende las etapas de (a') la extracción del medio en el recipiente de cultivo descrito anteriormente al que se adhieren las células adherentes y el lavado de las células adherentes con la solución de lavado celular; (b') el desprendimiento de las células adherentes del recipiente de cultivo por tratamiento enzimático proteolítico usando la enzima proteolítica descrita anteriormente; (c') la suspensión de las células adherentes desprendidas en la solución acuosa fisiológica que contiene la proteína descrita anteriormente; y (d') el subcultivo de una porción (50 % [v/v], 25 % [v/v], 12 % [v/v], o similar) de la suspensión celular usando un recipiente de cultivo fresco; es más preferido un método que comprende además la etapa de (p) la extracción de la solución de la suspensión de células y el lavado de las células adherentes con la solución acuosa fisiológica o solución acuosa fisiológica que contiene proteínas descritas anteriormente, entre las etapas (c') y (d').

La temperatura de cultivo que se aplica al subcultivo normalmente está en el intervalo de aproximadamente 30 a 40 °C y preferentemente es de 37 °C. La concentración de CO<sub>2</sub> durante el cultivo normalmente está en el intervalo de aproximadamente el 1 al 10 % y preferentemente es de aproximadamente el 5 %. La humedad durante el cultivo normalmente está en el intervalo de aproximadamente el 70 al 100 % y preferentemente es de aproximadamente el 95 al 100 %.

Ejemplos del medio aplicado al subcultivo pueden incluir el medio basal para cultivo de células animales que se ha descrito anteriormente, que contiene suero (FBS, CS, o similares) en el intervalo del 0,1 al 30 % (v/v) y el medio basal para cultivo de células animales descrito anteriormente, que contiene los aditivos necesarios para la proliferación celular en lugar de suero. Los ejemplos de aditivos pueden incluir fuentes de hierro (transferrina y similares), factores de crecimiento (insulina, EGF, FGF básico, factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales [GDNF], factores de células madre [SCF] y similares), poliaminas (putrescina y similares), esteroides (progesterona, β-estradiol, y similares), minerales (ácido selenioso o su sal), factores de adhesión (por ejemplo, heparina, sulfato de heparano, colágeno, y fibronectina), y agentes reductores (N-acetilcisteína, 2-mercaptoetanol,

catalasa, y similares). Estos medios también pueden contener sacáridos tales como glucosa, un antibiótico tal como la estreptomina, penicilina, o gentamicina, un tampón tal como Hepes, además de un inhibidor de la diferenciación de células madre (LIF, Wnt, TGF- $\beta$ , y similares) necesaria para el mantenimiento del estado no diferenciado de las células madre.

5 En el método de producción de una suspensión de células para el trasplante de acuerdo con la presente invención o el método de subcultivo *in vitro* anterior para una célula adherente, cada etapa se lleva a cabo preferentemente en condiciones asépticas usando un banco limpio o similar con el fin de evitar la contaminación de polvo, bacterias, y similares.

10 El kit para la producción de una suspensión de células para el trasplante o el kit para el subcultivo *in vitro* de una célula adherente no está particularmente limitado siempre que esté limitado a su uso como kit para la producción de una suspensión de células para el trasplante o limitado a su uso como kit para el subcultivo *in vitro* de una célula adherente, y comprende la solución de lavado celular y una solución acuosa fisiológica que comprende una enzima proteolítica. El kit puede comprender un prospecto en el envase que describe el efecto supresor de muerte celular debido al tratamiento enzimático proteolítico. Puede comprender además una pipeta, un tubo de centrifuga, y similar, y se puede ejemplificar en particular preferentemente por aquellos que además comprenden la enzima proteolítica descrita anteriormente.

20 La presente invención se describirá más específicamente a continuación con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no están destinados a limitar el alcance técnico de la presente invención.

### Ejemplos

#### 25 Ejemplo 1

1. Confirmación de la supresión de la muerte celular usando trehalosa en una solución de lavado celular antes del tratamiento enzimático proteolítico

#### 30 1-1 Material

1-1-1 3 % (p/v) de solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa

35 3 g de trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) se mezclaron con 90 ml de solución de lactato de Ringer ("Lactec Injection" de Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), que después se disolvió utilizando un agitador. La solución resultante se ajustó a un volumen de 100 ml con la solución de lactato de Ringer y a continuación se esteriliza usando un filtro de 0,22 micras en una cabina de seguridad, y se dispensó 10 ml de cada una.

1-1-2 Células madre mesenquimales humanas de médula ósea (BM-hMSC)

40 Se prepararon hMSC-BM (de Lonza Group Ltd.) de acuerdo con los procedimientos descritos en [1] a [9] a continuación y se utilizan en el presente experimento.

45 [1] Se cultivó hMSC-BM en una incubadora con el 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C en presencia de un kit de medio específico para células madre mesenquimales humanas (de Lonza Group Ltd.) (en lo sucesivo denominado "medio MSC") usando un matraz de 75 cm<sup>2</sup>. Se observó el estado de las células bajo el microscopio, y el cultivo se lleva a cabo hasta que se alcanzó un estado de confluencia de aproximadamente el 90 %.

[2] El medio de MSC se retiró usando un aspirador, y las células se lavaron con 8 ml/matraz de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS [-]) (en lo sucesivo simplemente denominado "PBS") (de Invitrogen).

50 [3] Se retiró el PBS usando un aspirador, y se añadió 3,75 ml/matraz de tripsina-EDTA (de Lonza Group Ltd.), seguido de reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos.

[4] El matraz se agitó suavemente, mientras se observaban las células bajo un microscopio hasta que aproximadamente el 90 % de las mismas se desprendieron.

55 [5] Se añadieron 3,75 ml/matraz de medio de MSC para detener la reacción de tripsina, y las células se recuperaron mediante pipeteo y se transfirieron a un tubo de centrifuga de 50 ml.

[6] La centrifugación se lleva a cabo a 600 × g y 22 °C durante 5 minutos.

[7] Al medio de MSC se le retira el sobrenadante usando un aspirador, y se añadió 5 ml/matraz de medio de MSC, seguido por suspensión del sedimento celular (precipitado).

60 [8] Se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión de células y se mezcla con 10  $\mu$ l de azul de tripano al 0,4 % (de Gibco) para medir el número de células vivas utilizando un contador de células.

[9] Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos a 1 × 10<sup>5</sup> células/2 ml/pocillo, y después se cultivaron en una incubadora con el 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. La cantidad total del medio de MSC se intercambió con medio fresco cada 3 a 4 días.

65



## 1-2 Método

Para confirmar que el uso de la solución de lavado celular en una solución de lavado celular antes del tratamiento enzimático proteolítico suprime la muerte celular, se llevó a cabo un experimento de acuerdo con los procedimientos descritos en [1] a [5] a continuación.

[1] El medio de MSC se aspiró/retiró de la placa de 6 pocillos a la que se adhieren las hMSC-BM, a la que después se añadió 2 ml/pocillo de solución de lactato de Ringer que contiene el 3 % (p/v) de trehalosa (LRT al 3 %) a 25 °C, seguido de incubación a 25 °C durante 1 minuto (tratamiento de lavado antes del tratamiento enzimático). Se utilizó PBS como control.

[2] Después de aspirar/extraer el LRT al 3 %, se añadió 1 ml/pocillo de tripsina-EDTA (de Lonza Group Ltd.) mantenida a 25 °C, seguido de incubación a 25 °C durante 15 minutos (tratamiento enzimático).

[3] Se añadió el medio de MSC a 25 °C por 1 ml de suspensión de células (tratamiento de terminación de una reacción de la enzima), y a continuación la suspensión de células se transfirió a un tubo cónico de centrifugadora de 15 ml.

[4] La centrifugación se lleva a cabo a 600 × g y 25 °C durante 5 minutos, y el sobrenadante se aspiró/retiró, seguido por suspensión en 100 µl de PBS enfriado en hielo para cada pocillo (tratamiento de lavado después del tratamiento enzimático).

[5] Se tomaron 10 µl de la suspensión de células y se mezclaron con 10 µl de azul de tripano, seguido por la medición del número de células usando un contador de células bajo un microscopio para evaluar la cantidad de células muertas.

## 1-3 Resultado

Considerando que, cuando las células se lavaron con PBS antes del tratamiento con tripsina, la cantidad de células muertas después del tratamiento con tripsina fue del 34,7 % (Figura 1, primera barra de la izquierda), cuando las células se lavaron con LRT al 3 % antes del tratamiento con tripsina, la cantidad de células muertas después del tratamiento con tripsina fue del 16,3 % (Figura 1, segunda barra de la derecha); se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las dos cantidades ( $p < 0,001$ ). Estos resultados muestran que el lavado de las células utilizando una solución acuosa fisiológica que contiene trehalosa, como LRT, antes del tratamiento con tripsina disminuye la cantidad de células muertas después del tratamiento con tripsina en comparación con que el uso de una solución acuosa fisiológica que no contiene trehalosa. Como Ejemplo comparativo 1, cuando las células se lavaron con PBS antes del tratamiento con tripsina (la etapa de [1] en el "Método 1-2" del Ejemplo 1 anterior [tratamiento de lavado antes del tratamiento enzimático]) y las células se lavaron con LRT al 3 % después del tratamiento con tripsina (la etapa de [4] en el "Método 1-2" del Ejemplo 1 anterior [tratamiento de lavado después del tratamiento enzimático]), la cantidad de células muertas era del 32,8 % (Figura 1, segunda barra de la izquierda); esto podría confirmar que se redujo la cantidad de células muertas, pero no significativamente, en comparación a cuando se utilizó PBS como control (Figura 1, primera barra de la izquierda, cantidad de células muertas: 34,7 %); sin embargo, el efecto fue excelente en mayor medida cuando las células se lavaron con LRT al 3 % antes del tratamiento con tripsina ( $p < 0,001$ , Figura 1, comparación entre la segunda y tercera barras de la izquierda). Cuando las células se lavaron con LRT al 3 % antes del tratamiento con tripsina y las células se lavaron adicionalmente con LRT al 3 % después del tratamiento con tripsina, la cantidad de células muertas después del tratamiento con tripsina fue del 13,8 % (Figura 1, primera barra de la derecha); esto podría confirmar que se redujo la cantidad de células muertas, pero no significativamente, en comparación con cuando se usó LRT al 3 % antes del tratamiento con tripsina (Figura 1, segunda barra de la derecha, cantidad de células muertas: 16,3 %). Estos resultados muestran que el uso de trehalosa en el lavado celular después del tratamiento enzimático proteolítico puede reducir aún más la cantidad de células muertas por un efecto aditivo o sinérgico debido a la combinación con la solución de lavado celular de la presente invención.

## Ejemplo 2

2. Confirmación del efecto supresor de muerte celular por la solución de lavado celular se debe a la trehalosa y tiempo al estudio del tratamiento con solución de lavado celular que contiene trehalosa

## 2-1 Método

Además, para confirmar que el efecto supresor de muerte celular por LRT no se debió a LR sino que se debió a la trehalosa, se llevó a cabo un experimento cuando se usó LR como control para la solución de lavado antes del tratamiento con tripsina. Para estudiar simultáneamente el tiempo de tratamiento de lavado celular antes del tratamiento con tripsina, también se llevó a cabo el experimento de acuerdo con los procedimientos descritos en [1] a [5] a continuación.

[1] El medio de MSC se aspiró/retiró de la placa de 6 pocillos a la que se adherieron las hMSC-BM, a la que entonces se añadió 2 ml/pocillo de solución de lactato de Ringer que contiene el 3 % (p/v) de trehalosa (LRT al 3 %) a 25 °C, seguido de incubación a 25 °C durante 0,5, 1, 3, 5, 7, y 10 minutos (tratamiento de lavado antes del tratamiento enzimático). Se utilizó LR como control, y también se utilizó como control PBS, que habitualmente se

utiliza para una solución de lavado.

[2] Después de aspirar/retirar LRT al 3 %, se añadió 1 ml/pocillo de solución de tripsina-EDTA diluida (de Lonza Group Ltd.) en la que se mezcló PBS mantenido a 25 °C en cantidades iguales, seguido de incubación a 25 °C durante 20 minutos (tratamiento enzimático).

5 [3] El medio de MSC a 25 °C se añadió por 1 ml para suspender las células (tratamiento de terminación de una reacción de la enzima), y a continuación la suspensión de células se transfirió a un tubo cónico de centrifugadora de 15 ml.

[4] La centrifugación se lleva a cabo a 600 × g y 25 °C durante 5 minutos, y el sobrenadante se aspiró/retiró, seguido por suspensión en 100 µl de PBS enfriado en hielo para cada pocillo (tratamiento de lavado después del tratamiento enzimático).

10 [5] Se tomaron 10 µl de la suspensión de células y se mezclan con 10 µl de azul de tripano, seguido por la medición del número de células usando un contador de células bajo un microscopio para evaluar la cantidad de células muertas.

## 15 2-2 Resultado

Los resultados se muestran en la Figura 2. Por ejemplo, para un tiempo de tratamiento de lavado antes del tratamiento con tripsina de 10 minutos, mientras que cuando las células se lavaron usando LR antes del tratamiento con tripsina, la cantidad de células muertas después del tratamiento con tripsina fue del 42,1 %, cuando las células se lavaron con LRT al 3 % antes del tratamiento con tripsina, la cantidad de células muertas después del tratamiento con tripsina se redujo al 14,8 % (Figura 2); la disminución fue estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). No se observó ninguna diferencia significativa estadística entre el PBS y el LR. Estos resultados muestran que el efecto de suprimir la muerte celular por la solución de lavado celular no se debió al LR, sino que se debió a la trehalosa. Además, de manera similar para un tiempo de tratamiento de lavado celular con LRT antes del tratamiento con tripsina de 0,5 a 7 minutos, el efecto supresor de muerte celular se observó en la misma medida.

### Ejemplo 3

30 3. Estudio de la concentración de trehalosa aplicada a la solución de lavado celular

#### 3-1 Método

Entonces, para estudiar la concentración de trehalosa que se aplica a la solución de lavado celular, se llevó a cabo un experimento de acuerdo con los procedimientos descritos en [1] a [5] a continuación.

35 [1] El medio de MSC se aspiró/retiró de la placa de 6 pocillos a la que se adhirieron las hMSC-BM, a la que entonces se añadió 2 ml/pocillo de solución de lactato de Ringer que contiene cada una de las siguientes concentraciones (1, 3, 5, 7, 10, 12, o 15 % [p/v]) de trehalosa a 25 °C, seguido de la retención de calor a 25 °C durante 1 minuto (tratamiento de lavado antes del tratamiento enzimático). Se utilizó LR como control.

40 [2] Después de aspirar/retirar la solución de lavado antes del tratamiento enzimático de [1], se añadió 1 ml/pocillo de tripsina-EDTA (de Lonza Group Ltd.) mantenido a 25 °C, seguido de incubación a 25 °C durante 15 minutos (tratamiento enzimático).

45 [3] El medio de MSC a 25 °C se añadió por 1 ml para suspender las células (tratamiento de terminación de una reacción de la enzima), y a continuación la suspensión de células se transfirió a un tubo cónico de centrifugadora de 15 ml.

[4] La centrifugación se lleva a cabo a 600 × g y 25 °C durante 5 minutos, y el sobrenadante se aspiró/retiró, seguido por suspensión en 100 µl de PBS enfriado en hielo para cada pocillo (tratamiento de lavado después del tratamiento enzimático).

50 [5] Se tomaron 10 µl de la suspensión de células y se mezclan con 10 µl de azul de tripano, seguido por la medición del número de células usando un contador de células bajo un microscopio para evaluar la cantidad de células muertas.

#### 3-2 Resultado

55 Los resultados se muestran en la Figura 3. Cuando las células antes del tratamiento con tripsina se lavan usando LRT que tiene una concentración de trehalosa del 1 al 15 % (p/v), se redujo la cantidad de células muertas en cada una de sus concentraciones en comparación a cuando se usó LR que no contiene trehalosa (Figura 3); la disminución fue estadísticamente significativa. También se descubrió que cuando se utiliza la solución de lavado celular que tiene una concentración de trehalosa del 3 % (p/v), el efecto supresor de muerte celular era más destacado. Estos resultados muestran que se observa el efecto supresor de muerte celular cuando la concentración de trehalosa que se aplica a la solución de lavado celular se encuentra al menos en el intervalo del 1 al 15 % (p/v), y también muestran que se observa un excelente efecto supresor de muerte celular en particular cuando la concentración de trehalosa es del 1 al 7 % (p/v), en particular del 3 al 5 % (p/v).

### 65 Ejemplo 4

4. Análisis del efecto supresor de muerte celular cuando se añadió trehalosa en el tratamiento con tripsina o el tratamiento de terminación de una reacción de tripsina

#### 4-1 Método

5 Entonces, para analizar el efecto de suprimir la muerte celular cuando se añade trehalosa en el tratamiento con tripsina o tratamiento de terminación de una reacción de tripsina, se llevó a cabo un experimento de acuerdo con los procedimientos descritos en [1] a [5] a continuación.

10 [1] El medio de MSC se aspiró/retiró de la placa de 6 pocillos a la que se adhirieron las hMSC-BM, a la que a continuación se añadió 2 ml/pocillo de solución de lactato de Ringer que contiene el 3 % (p/v) de trehalosa a 25 °C, seguido de la retención de calor a 25 °C durante 1 minuto (tratamiento de lavado antes del tratamiento enzimático). Se utilizó LR como control.

15 [2] Después de aspirar/retirar la solución de lavado antes del tratamiento enzimático de [1], se añadió 1 ml/pocillo de una solución de tripsina que contiene trehalosa mantenida a 25 °C, en la que se añadió trehalosa a una concentración final del 3 % (p/v) de tripsina-EDTA (de Lonza Group Ltd.), seguido de incubación a 25 °C durante 15 minutos (tratamiento enzimático).

20 [3] Un medio de MSC que contiene trehalosa mantenida a 25 °C, en el que se añadió trehalosa a una concentración final del 3 % (p/v) a medio MSC se añadió por 1 ml para suspender las células (tratamiento de terminación de una reacción de la enzima), seguido por la transferencia de la suspensión celular a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml.

[4] La centrifugación se lleva a cabo a 600 × g y 25 °C durante 5 minutos, y el sobrenadante se aspiró/retiró, seguido por suspensión en 100 µl de PBS enfriado en hielo para cada pocillo (tratamiento de lavado después del tratamiento enzimático).

25 [5] Se tomaron 10 µl de la suspensión de células y se mezclan con 10 µl de azul de tripano, seguido por la medición del número de células usando un contador de células bajo un microscopio para evaluar la cantidad de células muertas.

#### 4-2 Resultado

30 Los resultados se muestran en la Figura 4. Como Ejemplo comparativo 2, cuando las células se lavaron con PBS antes del tratamiento con tripsina y el tratamiento enzimático se ha realizado mediante la solución de tripsina que contiene trehalosa (la etapa de [1] en "1-2 Método" del Ejemplo 1 anterior [tratamiento de lavado antes del tratamiento enzimático]), no se observó ningún cambio en la cantidad de células muertas en comparación a cuando se usó la solución de tripsina que no contiene trehalosa (comparación entre "tripsina + T" y "tripsina" en la Figura 4).  
 35 Estos resultados muestran que la adición de trehalosa en el tratamiento enzimático proteolítico no puede suprimir la cantidad de células muertas. Como Ejemplo comparativo 3, cuando las células se lavaron con PBS antes del tratamiento con tripsina y se utilizó el medio MSC que contiene trehalosa ("medio + T" en la Figura 4) en el tratamiento de terminación de una reacción de tripsina (la etapa de [3] en "1-2 Método" del Ejemplo 1 anterior (tratamiento de terminación de una reacción de la enzima), se redujo la cantidad de células muertas en comparación a cuando se utilizó el medio de MSC que no contiene trehalosa ("medio" en la Figura 4) (comparación entre la primera barra de la izquierda en la Figura 4 [cantidad de células muertas: 37,9 %] y la segunda barra de la izquierda en la Figura 4 [cantidad de células muertas: 33,9 %]). Estos resultados muestran que cuando las células se suspenden utilizando una solución fisiológica acuosa que contiene proteína, tal como el medio MSC, a la que se  
 45 añade la trehalosa, en el tratamiento de terminación de una reacción de la enzima después del tratamiento enzimático proteolítico, se puede reducir la cantidad de células muertas, en menor medida, en comparación a cuando se utiliza la solución de lavado celular. También se pudo confirmar que cuando las células se lavaron con LRT al 3 % antes del tratamiento con tripsina y, además, se usa un medio de MSC que contiene trehalosa en el tratamiento de terminación de una reacción de tripsina, la cantidad de células muertas después del tratamiento con tripsina fue del 13,0 % (Figura 4, tercera barra de la derecha) y se redujo la cantidad de células muertas, pero no significativamente, en comparación a cuando se usa LRT al 3 % antes del tratamiento con tripsina (Figura 4, cuarta barra de la derecha, cantidad de células muertas: 16,8 %). Estos resultados muestran que el uso de trehalosa en el tratamiento de terminación de una reacción de la enzima proteolítica puede reducir aún más la cantidad de células muertas por un efecto aditivo o sinérgico debido a la combinación con el uso de trehalosa en una solución de lavado celular antes del tratamiento enzimático proteolítico.

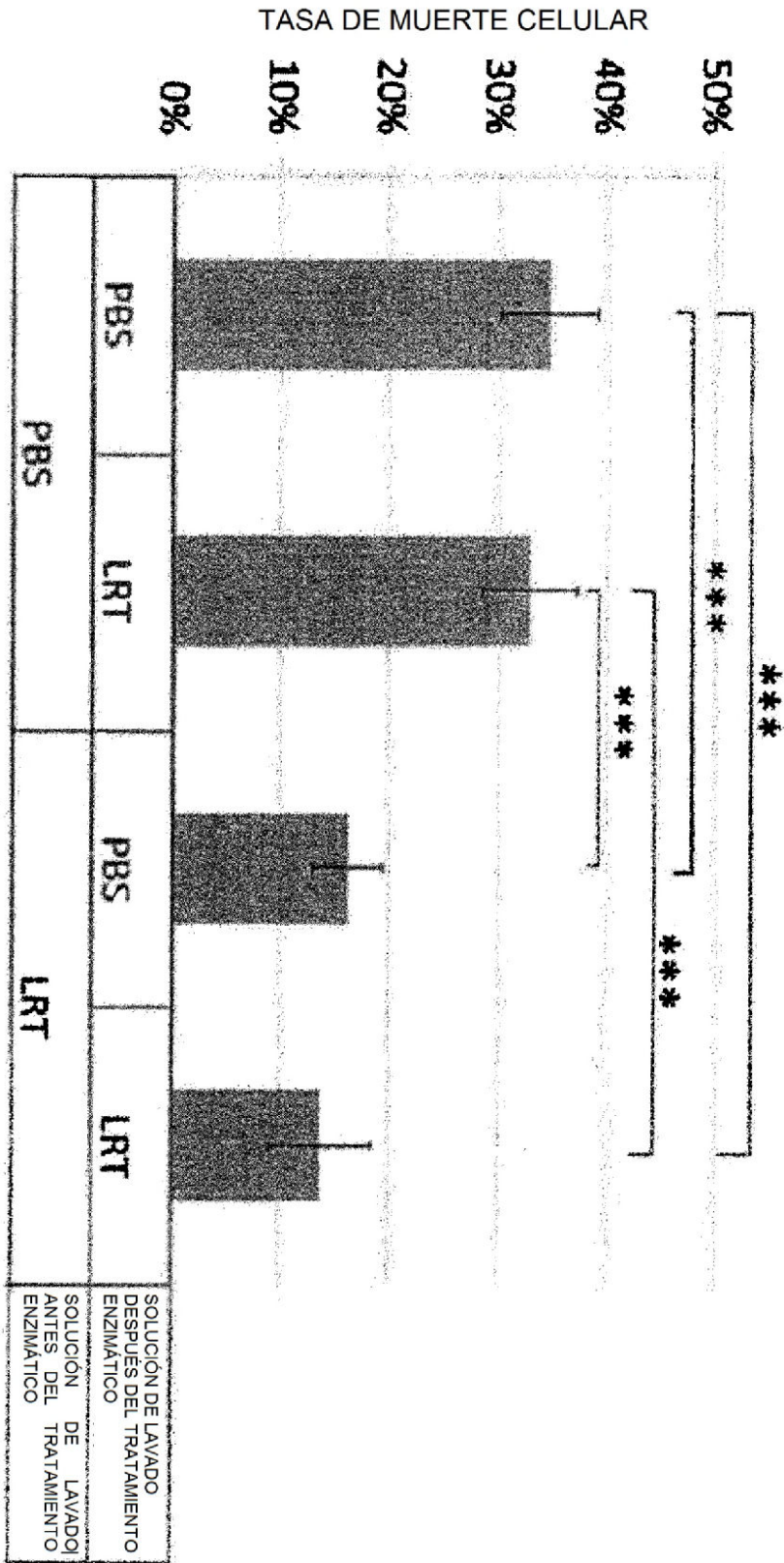
#### Aplicabilidad Industrial

60 La presente invención es útil en el campo del trasplante médico en la medicina regenerativa o similar, y en el campo del tratamiento del cáncer, ya que puede reducir el porcentaje de células muertas en una suspensión celular que contiene células madre, tales como MSC para proporcionar una suspensión de células de buena calidad.

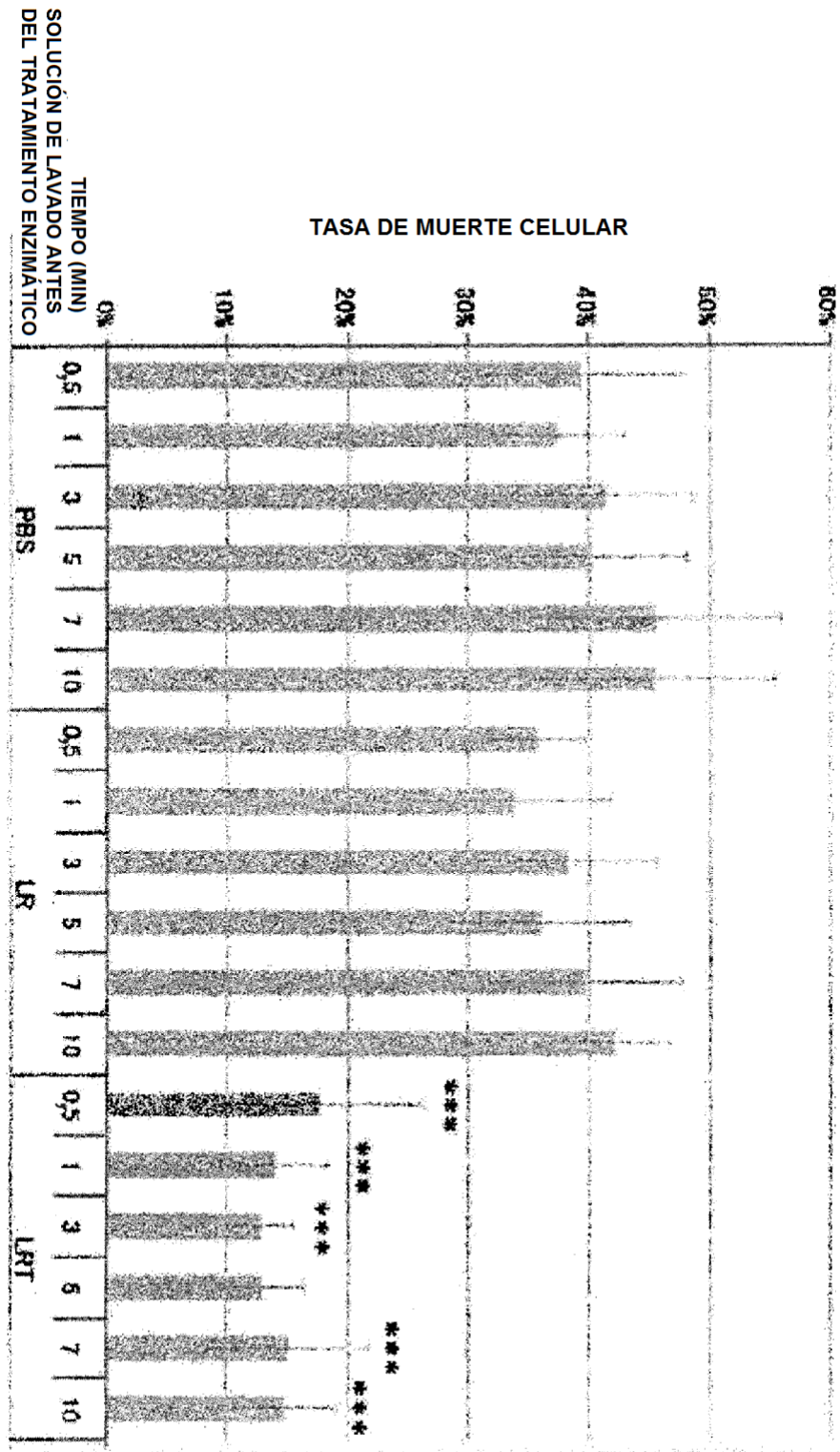
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de trehalosa, su derivado o una sal de la misma para reducir la muerte de células adherentes debido al tratamiento enzimático proteolítico, en el que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma se usa en un tratamiento de lavado celular antes del tratamiento enzimático proteolítico, en la que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma usada en el tratamiento de lavado celular antes del tratamiento enzimático proteolítico es en una solución acuosa fisiológica en una concentración del 0,1 al 20 % (p/v), en el que el tiempo de tratamiento del tratamiento de lavado celular antes del tratamiento con la enzima proteolítica se encuentra en el intervalo de 1 segundo a 20 minutos, y en el que el derivado de trehalosa es una glicosiltrehalosa en la que una o más unidades de azúcar están unidas a la trehalosa como disacárido.
- 10
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células son células madre mesenquimales.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma se encuentran en una solución acuosa fisiológica en una concentración del 1 al 15 % (p/v).
- 15
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en tripsina, lisilendopeptidasa, pronasa, pepsina, elastasa y colagenasa, preferentemente la enzima proteolítica es tripsina.
- 20
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enzima proteolítica es tripsina.
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tiempo de tratamiento del tratamiento de lavado celular antes del tratamiento con enzima proteolítica es de 30 segundos a 10 minutos.
- 25
7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma se utiliza adicionalmente en un tratamiento de terminación de una reacción enzimática para detener el tratamiento con enzimas proteolíticas.
- 30
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma usada en un tratamiento de terminación de una reacción enzimática está contenida en una solución acuosa fisiológica que contiene proteína.
- 35
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la solución acuosa fisiológica que contiene proteína es un medio basal que contiene suero para el cultivo de células animales.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma se utiliza adicionalmente en un tratamiento de lavado celular después del tratamiento con enzima proteolítica.
- 40
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la trehalosa, su derivado o una sal de la misma usada en el tratamiento de lavado celular después del tratamiento con enzima proteolítica está contenida en una solución acuosa fisiológica.

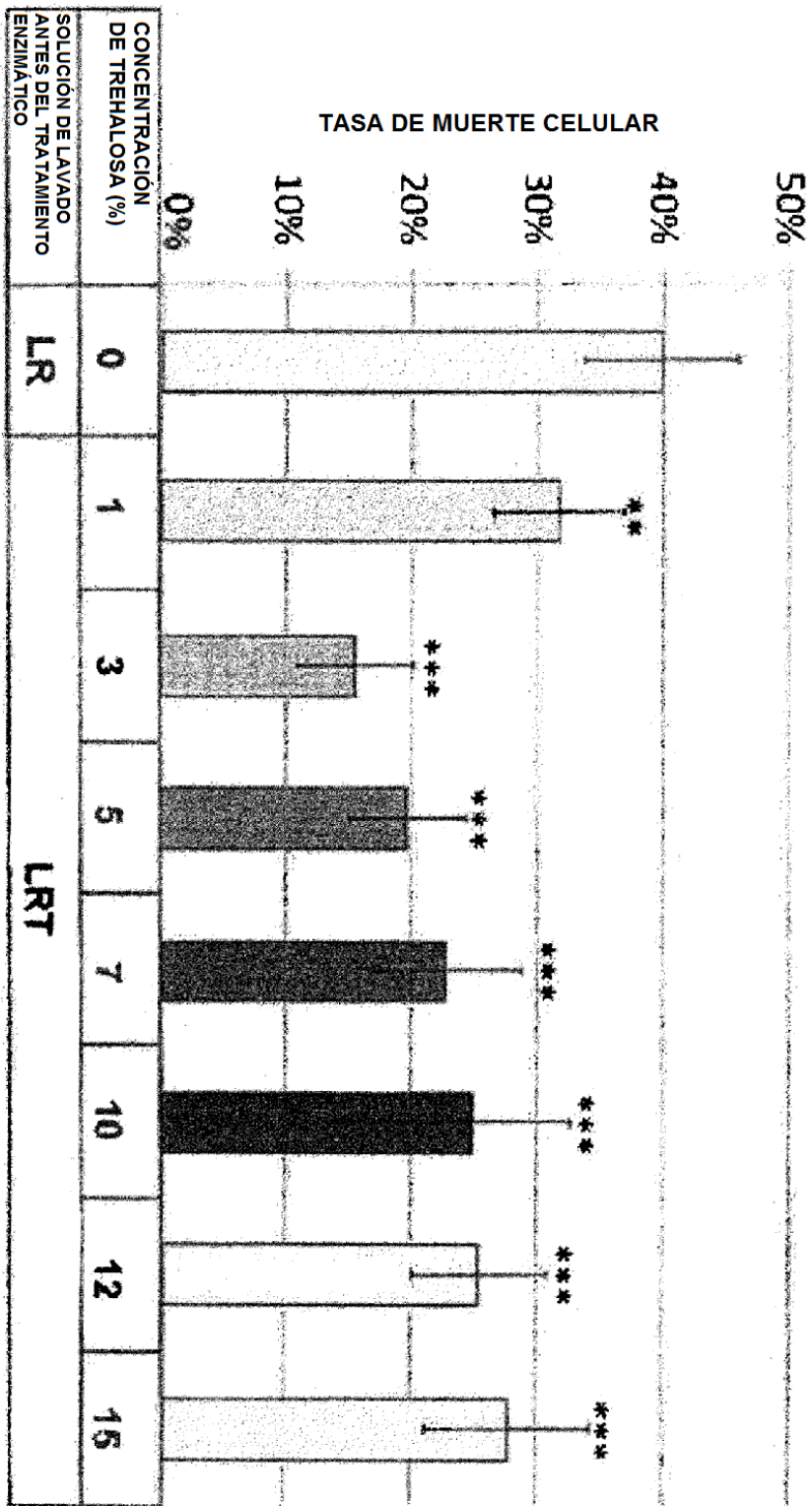
45



[Figura 1]



[Figura 2]



[Figura 3]

